

Габидинова Г.Ф.<sup>1</sup>, Тимербулатова Г.А.<sup>1,2</sup>, Фатхутдинова Л.М.<sup>1</sup>

# Принципы оценки генотоксичности углеродсодержащих наноматериалов *in vitro* (на примере углеродных нанотрубок) (обзор литературы)

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, г. Казань, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», 420061, г. Казань, Российская Федерация

**Введение.** Вопрос генотоксического действия наноматериалов на клетки вызывает основное беспокойство при исследовании новых наноматериалов, имея в виду их безопасность. Каждый мутаген считается потенциально канцерогенным, поэтому оценка генотоксичности необходима. Однако чёткая стратегия оценки генотоксического действия наноматериалов до сих пор не разработана.

**Материал и методы.** Материалом для анализа послужили источники литературы из библиографических баз PubMed, Scopus, РИНЦ.

**Результаты.** Физико-химическую характеристику наноматериалов проводят с помощью микроскопических методов высокого разрешения, методов светорассеяния. Перед проведением тестирования на генотоксичность необходимо знать цитотоксичность тестируемых НМ, чтобы выбрать соответствующий диапазон концентраций. Наиболее важные и значимые тесты основаны на определении жизнеспособности клеток. Популярным является МТТ-тест – колориметрический тест, оценивающий метаболическую активность клеток. Кроме него жизнеспособность можно определять с помощью микроскопии, проточной цитометрии, определения лактатдегидрогеназы. Только после предварительных этапов можно приступить к оценке генотоксичности. Набор тестов должен охватывать повреждения ДНК, генные мутации, хромосомные повреждения как чувствительные точки генотоксичности. Тест на мутацию генов млекопитающих *in vitro* обычно проводится с использованием клеток лимфомы мышей и выявляет широкий спектр генетических повреждений, включая делецию генов. Наиболее распространённым тестом для выявления хромосомных повреждений является анализ микроядер *in vitro*. Разрывы цепей ДНК чаще всего оцениваются с помощью теста ДНК-комет.

**Заключение.** Обязательными этапами изучения генотоксичности наноматериалов должны быть предварительные исследования, включающие физико-химическую характеристику и оценку цитотоксичности, а также изучение не только конечных точек генотоксичности, но и потенциально возможных механизмов.

**Ключевые слова:** генотоксичность; наноматериалы; углеродные нанотрубки; мутации; окислительный стресс; обзор

**Для цитирования:** Габидинова Г.Ф., Тимербулатова Г.А., Фатхутдинова Л.М. Принципы оценки генотоксичности углеродсодержащих наноматериалов *in vitro* (на примере углеродных нанотрубок) (обзор литературы). *Токсикологический вестник*. 2021; 29(6): 16-23. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-6-16-23>

**Для корреспонденции:** Габидинова Гульназ Фаезовна, аспирант, ассистент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» МЗ РФ, Казань. E-mail: [gabidinova26@yandex.ru](mailto:gabidinova26@yandex.ru)

**Участие авторов:** Габидинова Г.Ф. – концепция обзора; сбор материала в библиографических базах; анализ материала; написание текста; подготовка статьи к публикации. Тимербулатова Г.А. – сбор материала в библиографических базах; анализ материала; редактирование. Фатхутдинова Л.М. – анализ материала; редактирование текста; подготовка статьи к публикации. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Финансирование.** Исследование поддержано грантом Международного научного совета для молодых учёных ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Поступила в редакцию: 15.11.2021 / Принята в печать: 23.11.2021 / Опубликовано: 30.12.2021

Gabidinova G.F.<sup>1</sup>, Timerbulatova G.A.<sup>1,2</sup>, Fatkhutdinova L.M.<sup>1</sup>

# Principles for assessing the genotoxicity of carbon nanomaterials *in vitro* (on the example of carbon nanotubes) (literature review)

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation;<sup>2</sup>FBUZ «The Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan (Tatarstan)», Kazan, 420061, Russian Federation

**Introduction.** Genotoxicity of nanomaterials (NM) is becoming a major concern when investigating new NM for their safety. Each mutagen is considered to be potentially carcinogenic, therefore a genotoxicity assessment is necessary. However, a clear strategy for assessing the genotoxic effect of NM has not yet been developed.

**Material and methods.** The material for the analysis have included literature sources from the bibliographic databases PubMed, Scopus, RSCI.

**Results.** Physicochemical characterization of NM is carried out using high-resolution microscopic and light scattering methods. Before testing for genotoxicity, it is necessary to know the cytotoxicity of the tested NM in order to select the appropriate concentration range. The most important and significant tests are based on the cell viability. MTT assay is a colorimetric test that evaluates the metabolic activity of cells. In addition, viability can be determined using microscopy, flow cytometry, determination of lactate dehydrogenase. Genotoxicity evaluation can be carried out only after the preliminary steps. The strategy should include genotoxicity endpoints: DNA damage, gene mutations, chromosomal damage. The *in vitro* mammalian gene mutation test, usually performed using mouse lymphoma cells, detects a wide range of genetic damage, including gene deletions. The most common test for detecting chromosomal damage is an *in vitro* micronucleus assay. DNA strand breaks are most often assessed using the comet DNA assay.

**Conclusion.** Compulsory stages in the study of the genotoxicity of nanomaterials should be preliminary studies, including physicochemical characterization and assessment of cytotoxicity, as well as the study of the endpoints of genotoxicity and potential mechanisms.

**Keywords:** *genotoxicity; nanomaterials; carbon nanotubes; mutations; oxidative stress; overview*

**For citation:** Gabidinova G.F., Timerbulatova G.A., Fatkhutdinova L.M. Principles for assessing the genotoxicity of carbon nanomaterials *in vitro* (on the example of carbon nanotubes) (literature review). *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(6): 16-23. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-6-16-23> (In Russian)

**For correspondence:** *Gulnaz F. Gabidinova*, postgraduate student, assistant of the Department of Hygiene and Occupational Medicine, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kazan, 420012, Russian Federation. E-mail: [gabidinova26@yandex.ru](mailto:gabidinova26@yandex.ru)

## Information about the authors:

Gabidinova G.F., <https://orcid.org/0000-0003-2616-5017> Timerbulatova G.A., <https://orcid.org/0000-0002-2479-2474>Fatkhutdinova L.M., <https://orcid.org/0000-0001-9506-563X>

**Author contribution:** *Gabidinova G.F.* – the concept of the review; collection of material in bibliographic databases; analysis of the material; writing the text; preparation of the article for publication. *Timerbulatova G.A.* – collection of material in bibliographic databases; analysis of the material; editing the text. *Fatkhutdinova L.M.* – analysis of the material; editing the text; preparation of the article for publication. *All co-authors* – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study was supported by a grant from the International Scientific Board for Young Scientists of Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia.

Received: November 15, 2021 / Accepted: November 23, 2021 / Published: December 30, 2021

## Введение

Введение новых наноматериалов (НМ) в промышленность требует понимания влияния этих материалов на окружающую среду и здоровье человека. Углеродные нанотрубки (УНТ) имеют уникальные физико-химические свойства, которые обуславливают расширение

объёмов производства и сфер применения данных НМ, включая композитные материалы, строительство, наноэлектронику, нанобиотехнологию, разработку бионаносенсоров [1–3]. Постоянно растущее коммерческое применение в большом количестве потребительских товаров обуславливает необходимость исследования наноматериалов на предмет безопасности.

Основное беспокойство вызывает вопрос генотоксического действия наноматериалов, в том числе и углеродных нанотрубок, на клетки [4]. Генотоксичность описывает свойство химических или физических агентов, которые могут изменять генетическую информацию. Генотоксические события могут быть временными (восстановимые, обратимые повреждения) или же приводящими к мутациям в количестве или структуре генетического материала в клетке. Когда мутация присутствует в зародышевой клетке, она передаётся следующему поколению и может вызвать генетическое заболевание. В соматических клетках мутация критического гена может привести к раку. Таким образом, каждый мутаген считается потенциально канцерогенным [5].

Данные ряда проведённых экспериментов убедительно свидетельствуют о том, что многостенные углеродные нанотрубки МУНТ-7 (производитель Mitsui Ltd., Япония) классифицированы как возможный канцерогенный фактор для человека и отнесены Международным агентством по изучению рака (МАИР) к категории 2В [6]. В ряде других исследований *in vivo* и *in vitro* показан генотоксический потенциал многостенных и одностенных углеродных нанотрубок (МУНТ и ОУНТ) разных типов [4, 7–9]. Среди методов *in vivo*, используемых для оценки генотоксичности наноматериалов, выделяют метод ДНК-комет и микроядерный тест *in vivo*, анализ мутаций на трансгенных грызунах, оценка хромосомных aberrаций, метод оценки полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ) [7].

В соответствии с принципами 3R (снижение – reduction, уменьшение дистресса – refinement, замена – replacement) в отношении экспериментов на лабораторных животных, наблюдается переход от исследований на моделях *in vivo* к передовым моделям *in vitro*, имитирующих реальные взаимодействия клеток в организме. Эксперименты *in vitro* дают возможность изучить механизмы генотоксического действия. На сегодняшний день существует огромное количество методов для оценки генотоксичности в исследованиях на клеточных культурах. Однако правильная интерпретация и обобщение результатов исследований генотоксического потенциала наноматериалов требует общей стратегии и валидности используемых подходов [10].

*Цель работы* – определить стратегии оценки генотоксичности углеродных нанотрубок в экспериментах *in vitro*.

## Материал и методы

Анализ и обобщение сведений об имеющихся методах оценки генотоксичности *in vitro* и данных о возможных механизмах генотоксического действия УНТ с использованием баз данных Scopus, PubMed, РИНЦ.

## Результаты

Анализ исследований и обзоров по данной теме демонстрирует разнообразие используемых методов для оценки генотоксичности наноматериалов [10]. Однако наноматериалы, в отличие от химических веществ, заслуживают особого внимания в некоторых экспериментальных деталях и требуют оптимизации существующих протоколов испытаний [11]. Например, данные некоторых исследований свидетельствуют о существовании зависимости токсических эффектов от физико-химических свойств наноматериалов [12–20]. Поэтому комплексная характеристика и подготовка дисперсий наноматериалов имеют решающее значение при интерпретации результатов эксперимента.

Кроме того, использование некоторых традиционных методов исследования ограничено в связи с особыми свойствами НМ. Широко используемый для изучения генотоксических агентов тест Эймса не подходит для оценки генных мутаций, вызванных действием НМ, из-за небольшого размера бактерий и отличий клеточной стенки бактерий от мембран клеток человека [12].

На данный момент можно выделить несколько обязательных этапов в стратегии исследования генотоксичности наноматериалов:

### 1. Физико-химическая характеристика наноматериала

Физико-химические параметры наноматериалов, включая форму, размер, свойства диспергируемости и агрегации, свойства поверхности, могут влиять на токсикокинетику и токсикодинамику данных материалов.

*Форма.* Показано, что эндоцитоз волокнистых наноматериалов (например, углеродных нанотрубок) происходит сложнее и медленнее по сравнению со сферическими [12]. Форма углеродных нанотрубок затрудняет их поглощение фагоцитами, из-за чего может происходить повреждение макрофагов и высвобождение свободных радикалов из клеток [14].

*Размер (удельная площадь поверхности).* Потенциал образования активных форм кис-

лорода (АФК) увеличивается с уменьшением размера НМ. Площадь реакционноспособной поверхности увеличивается с уменьшением размера, и активные участки НМ вступают в реакцию с молекулярным кислородом, что приводит к образованию свободных радикалов [15]. Для УНТ показано, что площадь поверхности зависит от количества стенок и диаметра [16]. Площадь поверхности увеличивается с уменьшением внешнего диаметра УНТ [16].

*Диспергирование и агломерация.* Стабильность и биосовместимость дисперсии НМ может стать определяющим параметром при оценке влияния НМ на биологический объект [17]. Некоторые наночастицы могут обладать разными агломерационными свойствами в разных типах сред и, следовательно, могут по-разному взаимодействовать с различными биологическими системами [18]. Свойства диспергируемости и агломерации также влияют на распределение НМ в организме, тип взаимодействия НМ с клетками и индуцированные этим взаимодействием эффекты. Высокий уровень агломерации УНТ приводит к более выраженным токсическим эффектам по сравнению с УНТ с низким уровнем агломерации [19].

В ходе большинства экспериментов на клеточных культурах исходные наноматериалы диспергируют в среде для культивирования клеток. В условиях дисперсии поверхностные свойства наноматериалов могут изменяться. Например, фетальная бычья сыворотка в культуральной среде приводит к образованию так называемых белковых корон, которые довольно сильно меняют физико-химическую природу наноматериалов и, соответственно, их токсическое действие [20]. Поэтому точная интерпретация результатов исследований подразумевает анализ не только исходных наноматериалов, но и их суспензий.

*Поверхностный заряд.* Поверхностный заряд может определять коллоидную стабильность и адсорбцию биомолекул и ионов, впоследствии влияющих на взаимодействие НМ с биологическими объектами. Катионные поверхности склонны вызывать агрегацию тромбоцитов и гемолиз [21]. Они более токсичны, чем анионные поверхности, из-за их более сильного взаимодействия с отрицательными доменами белка или головными группами фосфолипидов на клеточных мембранах [22].

Правильное покрытие поверхности может устранить неблагоприятное влияние НМ, предотвращая агломерацию и высвобождение токсичных ионов. Показано, что МУНТ, покрытые диэтилентриаминпентауксусным диангидридом, не обладают значительным генотоксическим действием [23].

Чаще всего для визуализации формы, размера, морфологии поверхности используются микроскопические методы высокого разрешения, среди которых просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ) [24]. Методы светорассеяния, к которым относятся динамическое рассеяние света и анализ траекторий наночастиц, могут быть применены для оценки распределения НМ по размерам [24, 25]. Также методы светорассеяния могут использоваться для определения поверхностного заряда (дзета-потенциала) [26].

## **2. Исследование цитотоксичности перед оценкой генотоксичности**

Перед оценкой генотоксичности необходимо исследовать цитотоксичность наноматериалов и установить ЛК<sub>50</sub> (летальная концентрация, при которой 50% клеток гибнут), чтобы выбрать соответствующий диапазон концентраций для дальнейших экспериментов [11]. Диапазон доз зависит от типа теста на генотоксичность, применяемого к НМ.

Для анализа генных мутаций и микроядер выбирают концентрации, охватывающие диапазон от нецитотоксических до ЛК<sub>50</sub> [11]. При проведении тестов, выявляющих разрывы ДНК, используют только нецитотоксические концентрации НМ, так как разрывы ДНК могут быть индуцированы косвенно как следствие цитотоксичности. В ходе апоптотической гибели клеток одним из этапов является фрагментация ДНК, поэтому оценка генотоксичности при цитотоксических концентрациях может демонстрировать ложноположительные результаты [5].

Повреждение клеточной мембраны является одним из индикаторов цитотоксического действия. Живые клетки непроницаемы для красителей вследствие способности к восстановлению молекул красителя. Мертвые клетки имеют повреждённую и проницаемую клеточную мембрану, что определяет поглощение мёртвыми клетками различных красителей (например, трипанового синего) [27]. Другой распространённый метод – двойное окрашивание флуоресцентными красителями

ми пропидиум йодидом для мёртвых клеток и диацетатом флуоресцеина для живых клеток и последующий анализ с помощью микроскопии или проточного цитометра [28].

Кроме этого, мертвые или погибающие клетки можно обнаружить по утечке внутриклеточных веществ, таких как лактатдегидрогеназа (ЛДГ) [27]. Распространённым и удобным тестом является анализ alamarBlue™, основанный на восстановлении резазурина до высоко флуоресцентного резорурфина, или аналогичный тест МТТ [29].

Изучение проникновения наноматериалов в клетку позволяет оценить возможность взаимодействия с клеточными структурами. Визуализация также проводится с помощью микроскопических методов высокого разрешения (ПЭМ, СЭМ, конфокальная микроскопия, темнопольная микроскопия) [30,31]. Темнопольная микроскопия хорошо подходит для неокрашенных биологических образцов и требует минимальной пробоподготовки по сравнению с методами электронной микроскопии [32].

### 3. Оценка генотоксического действия в экспериментах *in vitro*

Чувствительными конечными точками генотоксичности являются повреждения ДНК, генные мутации и хромосомные повреждения.

**Генные мутации.** Мутагенный потенциал наноматериалов можно исследовать при оценке мутаций в определённых генах (например, в генах *Tk* (тимидинкиназа) или *Hprt* (гипоксантинфосфорибозилтрансфераза) в клетках млекопитающих *in vitro*. С помощью метода выявления мутантного гена *Hprt* в клеточной линии V79 было показано увеличение частоты генных мутаций при воздействии многостенных углеродных нанотрубок [33]. Анализ мутаций в гене *Tk* в клетках лимфомы мышей выявляет не только широкий спектр генетических повреждений, но и эпигенетическое подавление экспрессии гена [34]. Индукция генных мутаций на клетках лимфомы мышей была показана при воздействии различных форм МУНТ в высоких концентрациях [35].

**Хромосомное повреждение.** К хромосомным повреждениям можно отнести структурные хромосомные или хроматидные разрывы, дицентрики и другие аномальные хромосомы, а также потерю хромосом. Наиболее распространённым методом для выявления хромосомных повреждений является микро-

ядерный тест *in vitro*, который заключается в оценке микроядер в цитоплазме интерфазных клеток [36]. Микроядра образуются из фрагментов хромосом или целых хромосом, отстающих при делении клеток, образуя одно или несколько микроядер в цитоплазме. Микроядерный анализ выявляет как структурные повреждения хромосом (кластогенный эффект), так и численные хромосомные изменения (анеугенный эффект).

Противоречивые результаты получены при оценке хромосомных повреждений при воздействии МУНТ и ОУНТ на клетки. ОУНТ в концентрациях 0,1 мкг/мл и выше вызывали образование микроядер в клетках мышинных макрофагов RAW264.7, однако не приводили к значимой индукции хромосомных повреждений в культуре фибробластов лёгкого китайского хомячка V79 [37, 38]. МУНТ-7 приводил к увеличению формирования микроядер в культуре клеток лёгких человека A549 в концентрациях выше 20 мкг/мл, при этом было показано появление двуядерных и мультиядерных клеток на низких концентрациях (0,02–5 мкг/мл) в исследовании фибробластов китайского хомячка CHL/IU [39, 40].

**Повреждения ДНК.** К повреждениям ДНК относят однонитевые или двунитевые разрывы цепей ДНК. Появление разрывов ДНК можно оценить с помощью метода ДНК-комет, который является методом выбора для исследования повреждений клеточной ДНК, вызванных НМ [41]. Этот анализ представляет собой простой, надёжный и удобный метод, широко используемый для тестирования генотоксичности химических веществ и НМ. Высокая чувствительность анализа, обнаруживающего от 100 до нескольких тысяч разрывов на клетку, позволяет обнаруживать также слабые генотоксические агенты. Модификации метода ДНК-комет также позволяют обнаруживать специфичные поврежденные основания и оценивать эффекты окислительного стресса на ДНК [42].

На участках разрывов ДНК образуются локальные скопления или модификации белков. Их можно визуализировать с помощью микроскопии после иммуноцитохимического (или иммуногистохимического) окрашивания или флуоресцентного мечения белков. Например, гистоновый белок  $\gamma$ H2AX предложен в качестве потенциального биомаркера двухцепочечных разрывов ДНК и широко используется в оценке генотоксичности НМ [11]. Данный гистон накаплива-

ется в непосредственной близости от двухцепочечных разрывов ДНК, способствуя их репарации.

Метод ДНК-комет наиболее часто используется для оценки генотоксического потенциала углеродных нанотрубок, в меньшей степени исследователи применяют определение гистона  $\gamma$ H2AX. В основном получены результаты, свидетельствующие о генотоксичности МУНТ и ОУНТ [43], лишь в немногочисленных исследованиях не выявлена индукция разрывов цепей ДНК [44].

#### 4. Исследование механизмов генотоксического действия наноматериалов

Помимо изучения конечных точек генотоксичности, решающее значение в понимании практического приложения результатов имеют механизмы генотоксического действия. Различают прямые и косвенные механизмы генотоксичности НМ, захваченные клетками, они могут вступать в прямой контакт с генетическим материалом, физически или химически вызывая повреждение. Однако наиболее вероятный механизм генотоксичности, вызванной НМ, является косвенным, через промежуточные биомолекулы, которые либо участвуют в нормальной функции генома или делении клеток, либо атакуют ДНК, вызывая повреждение ДНК или хромосомные аномалии. Окислительный стресс считается ключевым косвенным механизмом генотоксичности, вызванной НМ. Индукция активных форм кислорода (АФК) НМ может вызывать повреждение ДНК, а также повреждение липидов, белков и других клеточных компонентов [33].

Механизмы генотоксичности, индуцированной наноматериалами, также делятся на первичные и вторичные. В первичных механизмах повреждение генетического материала реализуется через прямое взаимодействие НМ с ДНК либо через воздействие ионов и активных форм кислорода (АФК), появление которых индуцировано НМ. Во вторичных механизмах появление АФК обусловлено воспалением и активацией фагоцитов при попадании НМ в организм [33].

Однако для НМ показаны и специфичные механизмы генотоксического действия. Например, УНТ могут нарушать процесс деления клеток, вызывая разрывы хромосом, создание моно- и полиполярных центриолей, нарушение правильной функции центросом [43]. Из-за структурного сходства с микротрубочками УНТ могут имитировать или

вмешиваться в процессы, связанные с микротрубочками [43, 45]. Более того, УНТ могут нарушать митоз из-за интеграции с центросомным аппаратом и митотическим веретеном, что приводит к образованию моно- или полиполярных центросом [46]. Последствиями этого неправильного процесса являются ломка хромосом и анеуплоидия.

#### 5. Использование трехмерных моделей *in vitro*

Стандартные тесты на генотоксичность *in vitro* проводятся на монослойных культурах клеток, что позволяет оценить только первичные механизмы генотоксичности. Однако вторичный механизм генотоксичности НМ, опосредованный фагоцитами, играет большую роль в индукции изменений в ДНК [47, 48]. Поэтому одним из новейших направлений в оценке генотоксичности НМ является использование сложных клеточных моделей *in vitro*, основанных на трехмерных структурах либо одного типа клеток, либо совместных культур двух или более типов клеток. Считается, что применение трехмерных моделей в токсикологии даёт надёжные данные, которые более актуальны для оценки генотоксичности у людей, чем стандартные 2D-модели [49, 50].

Основным путём воздействия углеродных нанотрубок на организм человека является респираторный. Большинство исследований оценки токсичности данных НМ *in vitro* проводится в условиях, не отражающих физиологические при вдыхании. Метод культивирования клеток на границе раздела воздух-жидкость (air-liquid interface) позволяет предотвратить взаимодействие с компонентами среды для культивирования клеток. Воздействие двух типов МУНТ (Mitsui-7 и Nanocyl) было изучено в модели совместного культивирования, включающей альвеолярные эпителиальные клетки, фибробласты и макрофаги, на границе раздела воздух-жидкость. При этом острое или продолжительное воздействие различных концентраций МУНТ (2–10 мкг/см<sup>2</sup>) не вызывало цитотоксического или профибротического эффекта [51].

#### Заключение

Изучение генотоксичности наноматериалов должно включать в себя исследование чувствительных конечных точек (генные мутации, хромосомные повреждения, разрывы ДНК), а также исследование механизмов, потенциально ведущих к генотоксическим эф-

фектам. Помимо этого, обязательными этапами должны стать предварительные исследования, включающие физико-химическую характеристику наноматериалов и оценку цитотоксического действия.

Помимо этого, особое внимание следует уделить новым направлениям изучения гено-

токсичности наноматериалов, среди которых можно выделить изменение экспрессии генов и эпигенетику. Оценка токсического действия наноматериалов в 3D-моделях *in vitro* может открыть доступ к наиболее надёжным данным, отражающим реальные взаимодействия с клетками в организме человека.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- [Электронный ресурс]. URL: <https://www.transparencymarketresearch.com/press-release/carbon-nano-tubes-market.htm> (Дата обращения: 24.10.2021 г.)
- Liu Z., Tabakman S., Welscher K., Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2009; 2: 85. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9009-8>
- Chen R.J., Bangsaruntip S., Drouvalakis K.A. et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 4984-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0837064100>
- Masato Naya, Norihiro Kobayashi, Kohei Mizuno, Kyomu Matsumoto, Makoto Ema, Junko Nakanishi. Evaluation of the genotoxic potential of single-wall carbon nanotubes by using a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2011; 61(2): 192-8. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.07.008>
- DeMarini D.M. The role of genotoxicity in carcinogenesis. In: Baan R.A., Stewart B.W., Straif K., editors. *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis.* Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2019. (IARC Scientific Publications, No. 165.) Chapter 12.
- Grosse Y., Loomis D., Guyton K.Z., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Scoccianti C., Mattock H., Straif K. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014; 15(13): 1427-8. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71109-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71109-X)
- Toyokuni S. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(15): 2098-110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.011>
- Li Z., Hulderman T., Salmen R., Chapman R., Leonard S.S., Young S.H., Shvedova A., Luster M.I., Simeonova P.P. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(3): 377-82. <https://doi.org/10.1289/ehp.9688>
- Shvedova A.A., Kisin E., Murray A.R., Johnson V.J., Gorelik O., Arepalli S., Hubbs A.F., Mercer R.R., Keohavong P., Sussman N., Jin J., Yin J., Stone S., Chen B.T., Deye G., Maynard A., Castranova V., Baron P.A., Kagan V.E. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(4): L552-65. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90287.2008>
- Elespuru R., Pfuhler S., Aardema M.J., Chen T., Doak S.H., Doherty A., Farabaugh C.S., Kenny J., Manjanatha M., Mahadevan B., Moore M.M., Ouédraogo G., Stankowski L.F. Jr., Tanir J.Y. Genotoxicity Assessment of Nanomaterials: Recommendations on Best Practices, Assays, and Methods. *Toxicol Sci.* 2018; 164(2): 391-416. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy100>
- Kohl Y., Rundén-Pran E., Mariussen E., Hesler M., El Yamani N., Longhin E.M., Dusinska M. Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment-A Review. *Nanomaterials (Basel).* 2020; 10(10): 1911. <https://doi.org/10.3390/nano10101911>
- Clift M.J.D., Raemy D.O., Endes C., Ali Z., Lehmann A.D., Brandenberger C., Petri-Fink A., Wick P., Parak W.J., Gehr P. et al. Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria. *Nanotoxicology.* 2013; 7: 1373-85. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.741725>
- Zhisong Lu, Yan Qiao, Xin Ting Zheng, Chan-Park M.B., Chang Ming Li. Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe quantum dot-cystine composites. *Med. Chem. Commun.* 2010; 1: 84-6. <https://doi.org/10.1039/c0md00008f>
- Park Ki Ho, Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. Single-walled Carbon Nanotubes Are a New Class of Ion Channel Blockers. *Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278(50): 50212-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310216200>
- Peter P. Fu, Qingsu Xia, Huey-Min Hwang, Paresh C. Ray, Hongtao Yu. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2014; 22(1): 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.005>
- Birch M.E., Ruda-Eberenz T.A., Chai M., Andrews R., Hatfield R.L. Properties that influence the specific surface areas of carbon nanotubes and nanofibers. *Ann Occup Hyg.* 2013; 57(9): 1148-66. <https://doi.org/10.1093/annhyg/met042>
- Yuan X., Zhang X., Sun L., Wei Y., Wei X. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol.* 2019; 16(1): 18. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0299-z>
- Colvin V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 1166-1170. <https://doi.org/10.1038/nbt875>
- Wick P. et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2007; 168(2): 121-31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>
- Partikel K., Korte R., Mulac D., Humpf H.U., Langer K. Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol.* 2019; 10: 1002-15. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.101>
- Goodman C.M. et al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 2004. 15 (4): 897-900. <https://doi.org/10.1021/bc049951i>
- Hoshino A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Lett.* 2004; 4(11): 2163-9. <https://doi.org/10.1021/nl048715d.s001>
- Lacerda L. et al. Dynamic imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Adv. Mater.* 2008; 20(2): 225-30. <https://doi.org/10.1002/adma.200702334>
- Moore T.L., Rodriguez-Lorenzo L., Hirsch V., Balog S., Urban D., Jud C., Rothenutshaus B., Lattuada M., Petri-Fink A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44, 6287-305.
- Wang, L., Castranova, V., Mishra, A. et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary in vitro and in vivo toxicity studies. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7: 31. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-31>
- Youssry M., Al-Ruwaidhi M., Zakeri M. et al. Physical functionalization of multi-walled carbon nanotubes for enhanced dispersibility in aqueous medium. *Emergent mater.* 2020; 3, 25-32. <https://doi.org/10.1007/s42247-020-00076-3>
- Jos A., Pichardo S., Puerto M., Sánchez E., Grilo A., Cameán A.M. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro.* 2009; 23(8): 1491-6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.001>
- Al-Jamal K.T., Kostarelos K. Assessment of cellular uptake and cytotoxicity of carbon nanotubes using flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010; 625: 123-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-579-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-579-8_11) PMID: 20422386.
- Dalibor Breznán, Dharani Das, Christine MacKinnon-Roy, Benoit Simard, Premkumar Kumarathasan, Renaud Vincent. Non-specific interaction of carbon nanotubes with the resazurin assay reagent: Impact on in vitro assessment of nanoparticle cytotoxicity. *Toxicology in Vitro.* 2015; 29(1): 142-7. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.009>
- Timerbulatova G.A., Dunaev P.D., Dimiev A.M., et al. Comparative characteristics of various fibrous materials in in vitro experiments. *Kazan medical Journal.* 2021; 102(4): 501-9. <https://doi.org/10.17816/KMJ2021-501>
- Siegrist K.J., Reynolds S.H., Kashon M.L. et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11: 6. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-6>
- Fakhrullin L., Nigamatzyanova L., Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci. Total Environment.* 2021; 772: 145478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145478>
- Rubio L., El Yamani N., Kazimirova A., Dusinska M., Marcos R. Multi-walled carbon nanotubes (NM401) induce ROS-mediated HPRT mutations in Chinese hamster lung fibroblasts. *Environ. Res.* 2016; 146: 185-90. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.004>
- Cheng T.F., Patton G.W., Muldoon-Jacobs K. Can the L5178Y Tk+/- mouse lymphoma assay detect epigenetic silencing? *Food Chem. Toxicol.* 2013; 59: 187-90. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.007>
- Demir E., Marcos R. Toxic and genotoxic effects of graphene and multi-walled carbon nanotubes. *J Toxicol Environ Health A.* 2018; 81(14): 645-60. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1477314> Epub 2018 Jun 6. PMID: 29873610.
- Shibai-Ogata A., Kakinuma C., Hioki T., Kasahara T. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. *Mutagenesis.* 2011; 26: 709-19. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger037>
- Migliore L., Saracino D., Bonelli A., Colognato R., D'Errico M.R., Magrini A., Bergamaschi A., Bergamaschi E. Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 2010; 51: 294-303.
- Kisin E.R., Murray A.R., Keane M.J., Shi X.C., Schwegler-Berry D., Gorelik O., Arepalli S., Castranova V., Wallace W.E., Kagan V.E., Shvedova A.A. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2007; 70: 2071-9.
- Kato T., Totsuka Y., Ishino K., Matsumoto Y., Tada Y., Nakae D., Goto S., Masuda S., Ogo S., Kawanishi M., Yagi T., Matsuda T., Watanabe M., Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both invitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology.* 2013; 7(4): 452-61. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.674571>
- Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Takaya M., Koda S., Nagano K., Arito H., Fukushima S. Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysole A fibers. *J. Occup. Health.* 2010; 52: 155-66.
- García-Rodríguez A., Rubio L., Vila L., Xamena N., Velázquez A., Marcos R., Hernández A. The Comet Assay as a Tool to Detect the Genotoxic Potential of Nanomaterials. *Nanomaterials.* 2019; 9(10): 1385. <https://doi.org/10.3390/nano9101385>
- Collins A., El Yamani N., Dusinska M. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 107: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.001>
- Samadian H., Salami M.S., Jaymand M., Azarnezhad A., Najafi M., Barabadi H., Ahmadi A. Genotoxicity assessment of carbon-based nanomaterials; Have their unique physicochemical properties made them double-edged swords? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2020; 783: 108296. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108296>
- Jacobsen N.R., Pojana G., White P., Møller P., Cohn C.A., Smith Korsholm K., Wallin H. Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60fullerenes in the FE1-Muta™ Mouse lung



DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-6-16-23>  
Обзорная статья

- epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008; 49(6): 476–87. <https://doi.org/10.1002/em.20406>
45. Hevia L.G., Fanarraga M.L. Microtubule cytoskeleton-disrupting activity of MWCNTs: applications in cancer treatment. *J Nanobiotechnol*. 2020; 18: 181. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00742-y>
  46. Sargent L.M. et al. Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutation research* vol. 2012; 745(1-2): 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.017>
  47. Evans S.J., Clift M.J.D., Singh N., De Oliveira Mallia J., Burgum M., Wills J.W., Wilkinson T.S., Jenkins G.J.S., Doak S.H. Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*. 2017; 32: 233-41. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew054>
  48. Pfuhrer S., van Benthem J., Curren R., Doak S.H., Dusinska M., Hayashi M., Heflich R.H., Kidd D., Kirkland D., Luan Y. et al. Use of in vitro 3D tissue models in genotoxicity testing: Strategic fit, validation status and way forward. Report of the working group from the 7th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2020; 850–1.
  49. Nelson B.C., Wright C.W., Ibuki Y., Moreno-Villanueva M., Karlsson H.L., Hendriks G., Sims C.M., Singh N., Doak S.H. Emerging metrology for high-throughput nanomaterial genotoxicology. *Mutagenesis*. 2017; 32: 215–32. <https://doi.org/10.1002/adma.200702334>
  50. Elespuru R., Pfuhrer S., Aardema M.J., Chen T., Doak S.H., Doherty A., Farabaugh C.S., Kenny J., Manjanatha M., Mahadevan B. et al. Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods. *Toxicol. Sci*. 2018; 164: 391–416. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy100>
  51. Barosova H., Karakocak B.B., Septiadi D., Petri-Fink A., Stone V., & Rothen-Rutishauser B. An In Vitro Lung System to Assess the Proinflammatory Hazard of Carbon Nanotube Aerosols. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(15): 5335. <https://doi.org/10.3390/ijms21155335>

## ОБ АВТОРАХ:

**Габидинова Гульназ Фаезовна (Gabidinova Gulnaz Faezovna)**, аспирант, ассистент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань, [gabidinova26@yandex.ru](mailto:gabidinova26@yandex.ru)

**Тимербулатова Гюзель Абдулхалимовна (Timerbulatova Gyuzel Abdulkhalimovna)**, ассистент кафедры гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань; врач по общей гигиене отдела социально-гигиенического мониторинга ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», 420061, г. Казань, [ragura@mail.ru](mailto:ragura@mail.ru)

**Фатхутдинова Лилия Минвагизовна (Fatkhutdinova Liliya Minvagizovna)**, профессор, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой гигиены, медицины труда ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань, [liliya.fatkhutdinova@gmail.com](mailto:liliya.fatkhutdinova@gmail.com)

